云 南 植 物 研 究 2006, 28 (6): 570～574
Acta Botanica Yunnanica

鼠尾藓不同居群间形态及 RAPD 分析*

刘 丽, 朱永青, 王幼芳**
(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 选取采自黑龙江、内蒙古、陕西以及浙江地区的 8 个居群的鼠尾藓为实验材料, 对不同居群的鼠尾藓叶片的形态、叶细胞的大小及植物体的形态进行了观察比较, 同时运用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 探讨了鼠尾藓的遗传多样性。利用 13 条随机引物共获得 104 个条带, 其中多态性条带占 84.62%。鼠尾藓各居群间的 Dice 遗传距离为 0.37～0.66。POPGENE32 软件分析得到种的 Nei 基因多样性指数 (H) 为 0.3326, Shannon 指数 (I) 为 0.4877, 遗传分化系数 (G_{ST}) 为 0.3303。形态学观察的结果表明, 鼠尾藓的植物体及叶片的形态在居群间变异较小, 很好地代表了这个种的特征; 而叶细胞的大小及叶尖长度的变异程度较大, 说明这些形态特征易受环境影响, 代表了种下水平的差异。不同居群的鼠尾藓无论在遗传上还是在形态上都表现出明显的多样性, 说明鼠尾藓具有较强的适应环境的能力。

关键词: 鼠尾藓; 遗传多样性; RAPD; 形态特征
中图分类号: Q 943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2006)06-570-05

Morphological and RAPD Analyses of Different *Myuroclada maximowiczii* (Brachytheciaceae) Populations

LIU Li, ZHU Yong-Qing, WANG You-Fang**
(*School of Life Science, East China Normal University*, Shanghai 200062, China)

Abstract: The shapes of leaves, sizes of median laminal cells and forms of plants were compared among eight *Myuroclada maximowiczii* populations from Heilongjiang, Shaanxi, Zhejiang province and Inner Mongolia. The genetic diversity of different *M. maximowiczii* populations were also studied, using random amplified polymorphic DNA (RAPD). 104 RAPD bands from 13 primers were analyzed, of which 84.62% were polymorphic. The Dice genetic distances among eight *M. maximowiczii* populations varied from 0.37 to 0.66. POPGENE analysis showed that the Nei's gene diversity was 0.3326, and Shannon's Information index was 0.4877, and G_{ST} was 0.3303. According to morphological observations, the shapes of leaves and plants are very stable in populations, which indicate the species characters; but the sizes of median laminal cells and leaf tips are different, suggesting that they are deperdent on environment and could be the subspecies characters. The results show that there are obvious diversity among different *M. maximowiczii* populations, in light of both genetic and morphological characters. The results indicates that *M. maximowiczii* can adapt to various environment.

Key words: *Myuroclada maximowiczii*; Genetic diversity; RAPD; Morphological characters

鼠尾藓 (*Myuroclada maximowiczii* (Borszcz.) Steere et Schof.) 是青藓科鼠尾藓属 (*Myuroclada* Besch.) 植物, 全世界仅一种, 广泛分布于中国、日本、朝鲜半岛、俄罗斯远东地区及北美西部。植物体呈鲜绿色或淡绿色, 茎匍匐, 上生鳞片状叶, 枝直立或倾立, 密生覆瓦状排列的叶, 枝端渐尖, 呈鼠尾状 (胡人亮和王幼芳, 2005), 故名鼠尾藓。在我国北方鼠尾藓分布较广, 且外

---

* 基金项目: 国家自然科学基金 30570124、30370113
** 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: yfwang@bio.ecnu.edu.cn
收稿日期: 2006-02-10, 2006-07-06 接受发表
作者简介: 刘丽 (1980-) 女, 博士生, 主要研究领域: 苔藓植物系统学。

形似鼠尾，在野外易于分辨。苔藓植物大多生活在阴湿的环境，对环境要求苛刻，由于人类活动对自然环境的破坏，苔藓植物的生存环境也受到了威胁。通过多年的研究发现，苔藓植物很难在室内培养及移植，因此苔藓植物的保护工作尤为艰巨。物种的遗传多样性与其生存力之间具有相关性，遗传多样性越高，适应环境变化的能力越强，越容易扩展其分布范围和开拓新的环境，即使对无性繁殖占优势的种也不例外（Huenneke, 1991）。生物多样性研究也是制定保护对策的有用工具（Wu 等，2004）。鼠尾藓虽然是我国广布种，但其居群的分布范围比较狭小，因此有必要对其进行遗传多样性研究，以其对苔藓植物的保护提供理论依据。

随机扩增多态性 DNA（random amplified polymorphic DNA，RAPD）技术具有简单、快速、无需知道研究对象的遗传背景、所需的样本少且所包含的信息量大等优点，是研究遗传多样性的一种常用的标记。RAPD 技术标记的是显性遗传，不能区分纯合（AA）与杂合（Aa）的基因型(邹喻苹等，2001)，而苔藓植物生活史中单倍的配子体占优势，这就避免了 RAPD 的这种显性标记所带来的问题。Dale 等（1999），Selkirk（1997），Skotnicki 等（1998 a，b，2002）利用 RAPD 技术研究了南极洲、澳大利亚、新西兰等地苔藓植物的遗传变异，说明该技术可以应用于苔藓植物遗传多样性的研究。

本文拟通过对采自黑龙江、内蒙古、陕西以及浙江等地的鼠尾藓进行 RAPD 分析，并结合形态特征的比较，探讨鼠尾藓不同居群间遗传变异程度，为经典分类补充可供参考的依据，并为中国苔藓植物多样性的保护提供基础的资料。

1　材料与方法

1.1　材料

实验材料分别采自黑龙江五营、五大连池老黑山，陕西秦岭佛坪自然保护区，内蒙古阿尔山塔尔滨湖周围沼泽，浙江西天目山（表 1）。标本采集后自然晾干，冷冻保存备用。凭证标本保存于华东师范大学生物系标本馆（HSNU）。

1.2　形态观察

每个居群随机选取 7 个植物体，用 Olympus 解剖镜观察植物体的形态及分枝情况；每个植株取枝条中部的叶片 4～5 片，在 Olympus 显微镜下用目微尺测量叶中部细胞的长、宽以及叶尖的长短，并计算细胞的长宽比，比较鼠尾藓在居群内及居群间的形态差异。测量数据用 SPSS10.0 软件进行统计分析，并用 JMP5.1 软件进行 Hierarchical 聚类分析。

表 1　鼠尾藓各居群采集情况表

Table 1　The collecting information of different *Myuroclada maximowiczii* populations

居群 Population	采集地 Collecting location	生境 Habit	海拔(m) Altitude	标本采集号 Collecting No.
qa	陕西秦岭佛坪自然保护区偏崖子保护站	石上薄土生	1860	44
qb	陕西秦岭佛坪自然保护区凉风垭	树基生	2100	609 - 2
qc	陕西秦岭佛坪自然保护区偏崖子保护站	石生	2000	349
qd	陕西秦岭佛坪自然保护区三官庙保护站到光头山途中	石生	1500	1484
nmg	内蒙古阿尔山塔尔滨湖周围沼泽	石生	1250	491
hei	黑龙江伊春市五营	马路边石生	200	276
lao	黑龙江五大连池老黑山	砂土生	400	309
tian	浙江西天目山	水沟边石生	350	15

1.3　DNA 的提取和 RAPD 扩增

1.3.1　DNA 的提取　选择色泽鲜绿的植株洗净后，取茎先端 1 cm 左右用于 DNA 的提取。称取洗净的茎尖 0.05 g 置于 1.5 ml 的离心管中加 600 μl 裂解液（Tris-HCl pH8.0）0.2 mol/L；尿素 7 mol/L；十二烷基肌氨酸钠 2%；EDTA 0.05 mol/L）充分研磨，加 600 μl 酚 - 氯仿（1∶1）剧烈振荡，12 000 r/min 离心 5 min，取上清，用异丙醇和无水乙醇分别沉淀 DNA 一次。DNA 沉淀经 70% 乙醇洗涤后溶于 50 μl TE 中，- 20℃保存备用。

1.3.2　RAPD 扩增　RAPD-PCR 反应使用 20 μl 体系，其中包括：1.5 U Taq 酶，0.15 mmol/L dNTP，3 mmol/L Mg^{2+}，0.2 μmol/L 引物，1×buffer (以上药品均购自上海生工生物工程有限公司)，加入 DNA 模板的量为 2～3 ng。

PCR 反应在 MJ Research Minicycle PCR 仪上进行，扩增条件为：94℃ 预热 3 min；94℃ 1 min，33℃ 1 min，72℃ 1.5 min（45 个循环）；72℃ 延伸 7 min（Williams，1993）。每个反应重复两次以确定所得条带的可重复性。扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，凝胶成像系统记录结果。

1.3.3　数据的处理　RAPD 的条带根据有无用“1”、“0”标记后形成原始数据矩阵，用 RAPDistance 1.04 软件（Armstrong 等，1995）进行分析得到各居群间的遗传距离，用 NJ 法进行聚类分析。用 POPGENE32 软件（Yeh 等，1999）计算 Nei 基因多样性指数（H），Shannon 多样

性指数 (I) 和遗传分化系数 (G_{ST})。

2 结果与分析

2.1 形态特征的比较

实验中测量了4个形态学特征：叶中部细胞的长、宽、长宽比及叶尖的长短结果见表2。对居群内和居群间形态数据的差异程度进行单因素方差分析，多重比较结果显示：居群内7个个体的细胞宽及长宽比在绝大部分的居群内个体间都无显著差异，细胞长和叶尖的长短仅在部分居群内的个体中存在显著差异；而4个形态性状在居群间的差异较显著。

表2 不同居群间鼠尾藓形态特征的比较（数据表示为平均值±标准差）

Table 2 The comparation of morphological characters of different *Myuroclada maximowiczii* populations (data are showed as Mean±S.D.)

居群 Population	形态特征 Characters			
	叶中部细胞长 Median laminal cell length (μm)	叶中部细胞宽 Median laminal cell width (μm)	叶中部细胞长宽比 Median laminal cell length to width ratio	叶尖长 Leaf tip (μm)
nmg	27.88±3.43	7.65±1.12	3.70±0.65	28.14±14.28
hei	28.20±3.45	7.86±1.07	3.64±0.54	48.43±19.54
lao	29.29±3.67	7.59±1.11	3.94±0.68	30.82±17.97
tian	36.53±5.11	8.49±1.21	4.36±0.69	23.78±8.85
qa	30.18±4.90	7.35±1.21	4.19±0.84	61.11±18.38
qb	28.26±3.62	7.96±1.16	3.61±0.63	49.42±17.05
qc	30.27±3.21	8.28±1.26	3.71±0.58	32.97±12.76
qd	37.27±4.36	8.57±1.23	4.41±0.69	38.38±19.23

根据表2可以看出，来自不同居群的鼠尾藓在细胞长、宽、长宽比及叶尖长短等特征上具有一定的差异。其中秦岭d的叶中部细胞最长、最宽，且长宽比最大。从叶中部细胞的长度来看，秦岭d和天目山的居群间无差异 ($p = 1$)，与其他居群均具有极显著差异 ($p < 0.01$)。从叶中部细胞的宽度来看，秦岭b、c、d与天目山的居群无显著差异 ($p > 0.05$)，而与其他居群差异较大。叶中部细胞的长宽比一直被认为是比较稳定的性状，从8个居群的分析结果来看，天目山和秦岭a、d的值较大，且三者间无显著差异，但是与其它各居群有显著差异。叶尖的变化范围比较大 (23.78～61.11 μm)，其中秦岭a的叶尖最长，天目山的叶尖最短。

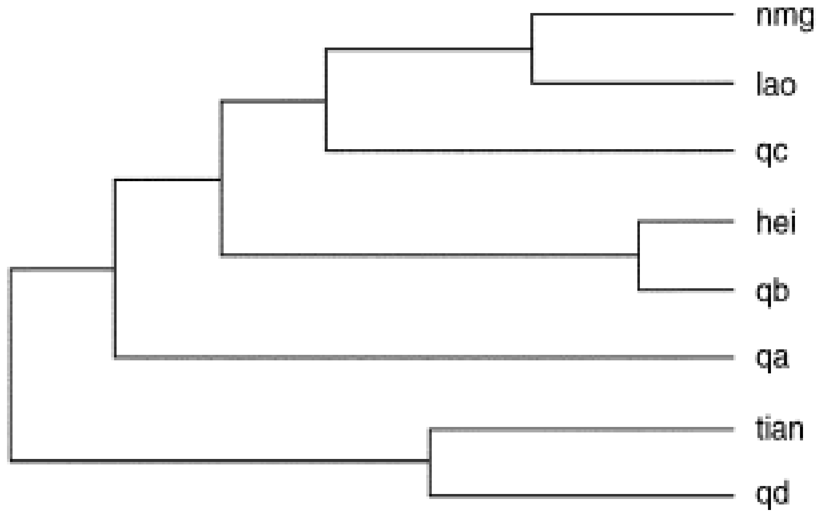

图1 利用JMP5.1软件对4个形态数据分析所得的各居群的分支图

Fig. 1 The dendrogram of populations according to 4 morphological data, using JMP5.1 software

利用JMP5.1软件，根据所研究的4个形态数据对鼠尾藓的8个居群进行聚类分析，结果如图1所示，秦岭d居群和天目山的居群相似性很高，聚到了一起；内蒙古和黑龙江老黑山的居群聚成一支，虽然秦岭的4个居群地理位置较近，但是聚类分析显示这4个居群并没有很高的相似性。

2.2 基于RAPD的遗传多样性

本实验对采自我国4个省份的8个居群的鼠尾藓植物进行了RAPD分析，对61条随机引物进行筛选，最后筛选出13条扩增条带较多，重复性好的引物用于进一步扩增，总共得到104个条带，

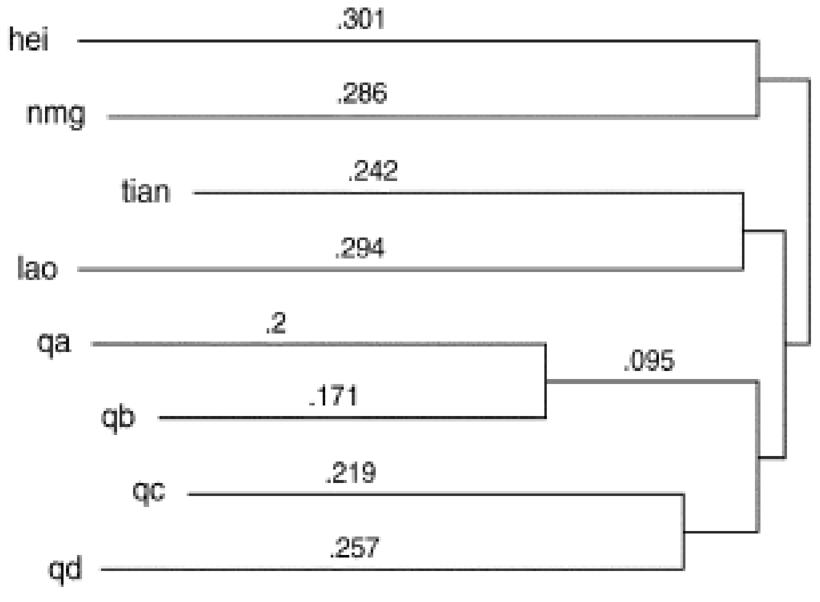

图2 利用NJ法得到的鼠尾藓8个居群的系统分支图（线上数字表示树长）

Fig. 2 The dendrogram of 8 Myuroclada maximowiczii populations, using NJ method (numbers on the lines are tree lengths)

其中多态性条带 88 条，占总条带数的 84.62%(表 3)。对所得的条带进行标记后用 RAPDistance1.04 软件进行分析得到各居群间的遗传距离（表4），利用 NJ 法构建邻接树。本文利用 6 种不同的遗传距离计算方法（Sokal and Sneath 2，Ochiai，Rogers and Tanimoto，Dice，Yule and Kendall，Jaccard 法）对不同居群间鼠尾藓的遗传距离进行了计算，各种不同算法所得的遗传距离有一定差异，但是，利用 NJ 法得到了分支完全一致的拓朴结构，图 2 为用 Dice（Nei and Li）方法计算遗传距离所得的邻接树，PTP‘ 检验值为 6.76，说明该系统树的各分支具有较高的支持率。

由图 2 可以看出，鼠尾藓 8 个居群共形成 2 大分支：黑龙江五营和内蒙古的居群构成一个分支，其他的 6 个居群聚成一支，其中秦岭的 4 个居群构成一个次级分支；浙江天目山和老黑山的居群聚成另一个次级分支。

表 3　实验所用随机引物的序列及产生条带的数目

Table 3　The sequences and the bands produced by the random primers

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	条带总数 Total bands	多态性条带数 Polymorphyic bands	多态性条带所占百分比（%）Percent of polymorphyic bands
s5	TGCGCCCTTC	8	8	100
s10	CTGCTGGGAC	10	10	100
s11	GTAGACCCGT	14	10	71.4
s21	CAGGCCCTTC	7	6	85.7
s23	AGTCAGCCAC	7	7	100
s65	GATGACCGCC	6	4	66.7
s478	GGCTTGGCCT	8	7	87.5
s253	GGCTGGTTCC	7	6	85.7
s293	GGGTCTCGGT	6	5	83.3
s277	GTCCTGGGTT	7	5	71.4
s1012	TCCAACGGCT	11	10	90.9
s1016	CAAGGTGGGT	8	7	87.5
s1021	GGCATCGGCT	5	3	60
	Total	104	88	84.6

表 4　利用 Dice 法计算的不同居群间鼠尾藓的遗传距离

Table 4　Dice genetic distances among different *Myuroclada maximowiczii* populations

居群 Population	qa	qb	tian	hei	nmg	lao	qc	qd
qa	0.0000							
qb	0.6159	0.0000						
tian	0.5180	0.5725	0.0000					
hei	0.6325	0.5040	0.5920	0.0000				
nmg	0.6062	0.6049	0.5080	0.5982	0.0000			
lao	0.6311	0.5916	0.5378	0.6433	0.6169	0.0000		
qc	0.5821	0.6159	0.5822	0.6585	0.6055	0.6017	0.0000	
qd	0.3718	0.5236	0.5774	0.5878	0.6338	0.5485	0.4763	0.0000

应用 POPGENE32 软件分析得到鼠尾藓 8 个居群的 Nei 基因多样性指数（H）为 0.3326，平均遗传多样性指数（H_S）为 0.2228，Shannon 多样性指数（I）为 0.4877，遗传分化系数（G_{ST}）为 0.3303。

3　讨论

本实验涉及的鼠尾藓 8 个居群分别采自中国的 4 个省份：陕西，黑龙江，内蒙古，浙江，分别分布于我国的中部，东北及东部，地理位置差距很大，这样就避免了居群间由于杂交而引起的遗传变异，秦岭的 4 个居群虽然分布较近，但是分别位于不同的保护站或不同的山体，居群间杂交的可能性较小。

从形态特征的结果来看，所研究的形态特征在不同居群间均有不同程度的差异，叶尖的变异最大，而一直被认为是较稳定的性状的叶中部细胞的长宽比，在所研究的 8 个居群中也存在一定差异。但是从观察结果来看，植物体及叶片的形态在居群间是很稳定的，这也是代表这个种的最重要的性状。

秦岭 a、b、c、d 4 个居群生活环境相似，都是采集于陕西秦岭地区，根据 RAPD 分析，这 4 个居群聚到了一起，说明这 4 个居群在遗传上比较相近。浙江天目山的居群，根据 RAPD 的分析结果，和黑龙江老黑山的居群聚到了一起并与秦岭的 4 个居群构成一个分支。黑龙江五营和内蒙古的一个居群在地理位置上比较靠近，都位于我国的东北地区，根据 RAPD 的结果二者聚到一起。由此可见不同居群间的遗传距离和它们的空间距离在一定范围内存在一定的相关性。天目山和老黑山的空间位置相距较远，但是 RAPD 结果显示二者聚成一支，究其原因可能是这两个居群海拔都在 400 m 左右，森林郁闭度较大，林下较潮湿，鼠尾藓生存的小环境相似，所以在分子水

平上两者表现出较高的相似性。

形态学数据和RAPD的结果构建的系统树结构并不完全相同，存在一定的差异，例如：形态学数据显示天目山和秦岭d居群相似性较高，聚到一起（图1），而RAPD的结果中二者相距较远(图2)。这表明形态学数据和分子数据并不是一一对应的。由于表型（形态）和基因型（分子）之间存在着基因表达、调控、个体发育等一系列复杂的中间环节，二者很难达到完全一致。另外，植物的表型是在以基因型为内因的基础上外加环境因子作用的结果，因此，形态和分子之间存在不一致性或者说不同步性也是可以理解的。物种的遗传多样性可以体现在从形态到DNA的各个不同水平上，故对其检测的方法可建立在不同层次的研究上，只有结合多种检测方法才能全面而正确的反映居群间的变异程度。

综上所述，鼠尾藓在所研究的8个居群间变异程度较高，主要表现在鼠尾藓在各居群间具有较高的遗传多样性（$H = 0.3326$，$H_s = 0.228$，$I = 0.4866$）。有研究表明泥炭藓属植物（$H_s = 0.122$）具有和其他藓类植物相当的遗传多样性水平（Thingsgaard，2002），护蒴苔 *Calypogeia fissa*（$H = 0.294$）的遗传多样性水平较高（Buczkowska，2004），与之相比鼠尾藓具有更高的遗传多样性水平。

各居群的鼠尾藓在叶细胞的大小及叶尖长短上具有一定程度的变异，因此推测这些形态特征是与环境相关的，代表了种下水平的差异；而植物体及叶片的形态在居群间变异较小，很好地代表了这个种的特征。在今后的研究中可扩大居群的范围和所统计性状的数量以得到更加可信的结论。根据Stengien and Flatberg (2000) 的研究，如果居群内及居群间的遗传变异小，说明其遗传多样性匮乏，该植物则很可能会濒临灭绝。我国的鼠尾藓具有较高的多样性是鼠尾藓适应不同环境生存的结果，这也说明鼠尾藓具有较强的适应环境的能力。

致谢 华东师范大学生命科学学院孙越副教授对本实验提出了宝贵意见；李粉霞、翟德逞、詹琪芳同学为本实验提供了部分标本；李相尧同学在数据处理方面提供了很多帮助。

〔参 考 文 献〕

胡人亮，王幼芳，2005．中国苔藓志 第7卷［M］．北京：科学出版社，154—155

邹喻苹，葛颂，王晓东，2001．系统与进化植物学中的分子标记［M］．北京：科学出版社，41—43

Amrstrong J, Gibbs A, Peakall R, *et al*, 1995. The RAPD istance Package [DL]. www.life.anu.edu.au molecular software rapd.html

Buczkowska K, 2004. Genetic differentiation of *Calypogeia fissa* Raddi (Hepaticae, Jungermanniales) in Poland [J]. *Plant Syst Evol*, **247**: 187—201

Dale TM, Skotnicki ML, Adam KD, *et al*, 1999. Genetic diversity in the moss Hennediella heimii in Miers Valley, southern Victoria Land, Antarctica [J]. *Polar Biol*, **121**: 228—233

Huenneke LF, 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations [A]. In Falk DA, Holsinger KE (eds). Genetics and Conservation of Rare Plants [M]. New York: Oxford University Press: 31—44

Selkirk PM, Skotnicki ML, Adam KD, *et al*, 1997. Genetic rariation in Antaretic populations of the moss *Sarconeurum glaciale* [J]. *Poalr Biol*, **18**: 344—350

Skotnicki ML, Ninham JA, Selkirk PM, 1998a. High levels of RAPD diversity in the moss *Bryum argenteum* in Australia, New Zealand and Antarctica [J]. *The Bryologist*, **101**: 412—421

Skotnicki ML, Selkirk PM, Ninham JA, 1998b. RAPD analysis of genetic variation and dispersal of the moss *Bryum pseudotriquetrum* from Southern Victoria Land, Antarctica [J]. *Polar Biol*, **20**: 121—126

Skotnicki ML, Bargagli R, Ninham JA, 2002. Genetic diversity in the moss *Pohlia nutans* on geothermal ground of Mount Rittmann, Victoria Land, Antarctica [J]. *Polar Biol*, **25**: 771—777

Stengien HK, Flatberg KI, 2000. Genetic variability in the rare Norwegian peatmoss *Sphagnum troenlandicum* [J]. *The Bryologist*, **103**: 794—801

Thingsgaard K, 2002. Taxon delimitation and genetic similarities of the *Sphagnum imbricatum* complex, as revealed by enzyme electrophoresis [J]. *J Bryol*, **24**: 3—15

Wu CI (吴仲义), Shi SH (施苏华), Zhang YP (张亚平), 2004. Ecology, evolution and biodiversity [J]. China voices: Supplement to nature, 426 (6968)

Williams G, Hanafey M, Rafalski JA, 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers [J]. *Method Enzymol*, **218**: 704—740

Yeh FC, Yang RC, Boyle T, *et al*, 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis [CP]. Edmonton: Department of Renewable Resources, University of Alberta